

Untersuchungen über einige Zusammenhänge
zwischen Stoffwechsel- und Sexualphysiologie
an dem Flagellaten *Chlamydomonas eugametos*

Von

INGO STIFTER

1959

5349/60

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt

von

Ingo Stifter





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555211_0035

Übersetzungsrecht vorbehalten
Nachdruck verboten

Aus dem Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. WEIDEL, Tübingen

Untersuchungen über einige Zusammenhänge zwischen Stoffwechsel- und Sexualphysiologie an dem Flagellaten *Chlamydomonas eugametos*

Von

Ingo Stifter

Mit 3 Abbildungen im Text.

1. Einleitung und Problemstellung

Die ersten Untersuchungen über Zusammenhänge zwischen Stoffwechsel- und Sexualphysiologie hat KLEBS (1) um die Jahrhundertwende unter anderem an *Chlam. media* gemacht. Er fand, daß sowohl Licht, als auch Nährsalzmangel die Gametenbildung fördert.

In neuerer Zeit haben SAGER und GRANICK (2) die Wirkung dieser beiden stoffwechselphysiologischen Faktoren auf die Gametogenese von *Chlam. reinhardi* näher untersucht. Im wesentlichen kamen sie zu ähnlichen Ergebnissen wie KLEBS. Abweichend von ihm fanden sie jedoch einen kausalen Zusammenhang zwischen Licht und Nährsalzmangel: Die hemmende Wirkung hoher Nährsalzkonzentrationen ist ausschließlich auf Stickstoff enthaltende Salze beschränkt, deren hemmende Wirkung durch Licht aufgehoben werden kann. Schwärmer einer Suspension von *Chlam. reinhardi* brauchen zur Auslösung der Sexualität umso mehr Licht, je höher die Stickstoffsalkonzentration ist. Bei der Kultur unter ausgesprochenen Stickstoffmangelbedingungen wird das Licht ganz bzw. fast ganz überflüssig. SAGER und GRANICK konnten sogar die Zellen heterotroph ohne Licht mit Azetat als Kohlenstoffquelle züchten und dabei bis 25 % Gameten erhalten. Demnach ist es also bei *Chlam. reinhardi* möglich, vegetative Zellen in Gameten zu verwandeln, wenn nur die N-Konzentration des Mediums genügend herabgesetzt wird. Die häufige Beobachtung, daß ältere Kulturen eine bessere Kopulationsbereitschaft haben als junge, wurde von SAGER und



GRANICK mit dem fortschreitenden Aufbrauch der Stickstoffsalze des Nährmediums erklärt. Diese von SAGER und GRANICK durch systematisches Arbeiten unter Variation aller möglichen Bedingungen aufgedeckten Beziehungen zwischen Lichtbedarf und Stickstoffgehalt des Substrates wurden durch weitere Untersuchungen von BERNSTEIN und JAHN u. a. an anderen Chlam.-Arten gestützt.

E. BERNSTEIN und L. T. JAHN (3) zeigten an *Chlam. moewusi* und an *Chlam. eugametos*, daß junge Kulturen nicht kopulieren, wenn der Stickstoffgehalt des Mediums hoch ist (über 0,03 % NH_4NO_3). Drückten sie aber die N-Konzentration des Substrates oder steigerten sie die Lichtintensitäten während der Kultur, so wurde die Gametogenese verbessert. Auch bei Verwendung alter Kulturen erhielt man größere Gametenzahlen als von jungen.

Y. TSUBO (4) konnte an seiner *Chlam. sp. 24* ebenfalls die Sexualität durch Aufschwemmen der Zellen in N-Mangelmedien auslösen und die Kopulation der Gameten durch die Zugabe von N-Salzen hemmen.

Danach schien es, als ob die Theorie der Lichtwirkung, die SAGER und GRANICK auf Grund ihrer Befunde an *Chlam. reinhardi* aufgestellt hatten, ganz allgemein gültig wäre. Nach ihrer Theorie soll die kopulationsfördernde Wirkung des Lichtes über die Photosynthese gehen. Als Folge der CO_2 -Assimilation soll der hemmende Stickstoff assimiliert werden.

R. A. LEWIN (5) fand an *Chlam. moewusi* mit dieser Theorie zum Teil übereinstimmende und zum Teil widersprechende Ergebnisse. Übereinstimmend mit der Annahme von SAGER und GRANICK, daß die Wirkung über die Photosynthese geht, fand LEWIN ein Wirkungsspektrum, das mit dem Absorptionsspektrum der Zellen innerhalb der Fehlergrenzen der Methode übereinstimmt. Weiterhin fand er, daß Sexualität und Photosynthese durch annähernd gleiche Konzentrationen von Phenylurethan gehemmt werden. Der Theorie widersprechend ist jedoch sein Befund, daß das Licht auch dann die Kopulationsfähigkeit induziert, wenn kein Kohlendioxyd anwesend ist.

Bei *Chlam. eugametos* ist das Wirkungsspektrum für die Kopulation vom Absorptionsspektrum der Zellen deutlich verschieden [FÖRSTER (6)], und die zur Gametenbildung erforderlichen Lichtmengen sind für nennenswerte Photosyntheseleistungen zu gering. Darüber hinaus verlieren aktive Gameten von *moewusi* und *eugametos*-♂♂, die durch Licht voll kopulationsfähig geworden waren, ihre Kopulationsfähigkeit sehr schnell, wenn sie wieder ins Dunkle gebracht werden. Das kann man aber nach der Theorie von SAGER und GRANICK nicht erwarten.

Nach bisher unveröffentlichten Ergebnissen von WIESE und FÖRSTER wird die Kopulationsfähigkeit bei *Chlam. eugametos* nicht nur durch N-Salze

gehemmt; vielmehr hemmen nahezu alle Salze bereits in sehr geringen Konzentrationen die Kopulationsfähigkeit.

Tabelle 1

NH ₄ Cl	10 ⁻⁴ mol	CaCl ₂	10 ⁻² mol
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 ⁻⁴ mol	Ca (NO ₃) ₂	10 ⁻² mol
KCl	10 ⁻³ mol	MgSO ₄	5 × 10 ⁻² mol
KNO ₃	10 ⁻³ mol	NaH ₂ PO ₄	5 × 10 ⁻² mol

Konzentrationen, durch die in aqua dest. sexuell voll aktive Gameten nahezu vollständig gehemmt werden (nach unveröffentlichten Versuchen von WIESE und FÖRSTER).

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Größenordnungen der Konzentrationen der verschiedenen Salze, die die Sexualität vollständig hemmen. Sie läßt keine Sonderrolle der Nitrats erkennen. Nur bei den Ammoniumsalzen ist die hemmende Konzentration sehr klein. Diese Daten beweisen, daß die Befunde an *Chlam. reinhardi* keineswegs so zu verallgemeinern sind, wie es zunächst schien. Offenbar sind entweder die Mechanismen der Lichtwirkung artspezifisch, oder es gibt bei den verschiedenen Arten verschiedene Lichtwirkungen, die sich überlagern und die je nach den Bedingungen im Vordergrund stehen können.

Die folgenden Untersuchungen zeigen, daß bei *Chlam. eugametos* tatsächlich zwei getrennte Lichtwirkungen zu beobachten sind, die sich durch die Wahl geeigneter Versuchsbedingungen differenzieren lassen.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, die Benutzung der Lichtwirkung für die Sexualität und Zusammenhänge zwischen Stoffwechsel- und Sexualphysiologie aufzudecken. Besonders interessierte die Frage, ob bei *Chlam. eugametos* das Licht nicht doch eine spezifische photochemische Reaktion zur Biosynthese der Gamone auslöst. Das war nach den Befunden von FÖRSTER und WIESE (7), LEWIN (5) und FÖRSTER (6) durchaus möglich.

2. Material und Methode

Die Versuche sind hauptsächlich an dem ♂♂-Klon von *Chlam. eugametos* gemacht worden, an dem FÖRSTER und WIESE gearbeitet haben.

Die Zellen wurden wie bisher in PETRI-Schalen auf KNOP-Agar gezüchtet (Agar 1,5 %, MgSO₄ 0,15 %, Ca (NO₃)₂ 0,6 %, KNO₃ 0,15 %, KH₂PO₄ 0,15 %) und in einem 18:6 Stunden-Rhythmus mit 65-Watt-Leuchtstoffröhren der Fa. OSRAM vom Typ HNG belichtet. Die Temperatur wurde während der Kultur konstant auf 19° C ± 1° C gehalten. Für die Versuche wurden die Zellen in der Regel mit einer Lösung folgender Zusammensetzung vom Agar abgeschwemmt:

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	$0,4 \times 10^{-4} \text{ mol}$
$\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	$0,5 \times 10^{-4} \text{ mol}$
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$0,7 \times 10^{-4} \text{ mol}$

Nach kurzer Zeit waren die Zellen beweglich. Während die ♀♀-Schwärmer darauf im Dunkeln nach einigen Stunden kopulationsfähig waren, brauchten die ♂♂-Schwärmer dazu noch zusätzlich eine gewisse Menge Licht, obwohl sie im Licht gezüchtet wurden.

Die abgeschwemmten Zellen wurden in ERLÉNMEYER-Kolben suspendiert und auf die gewünschte Zelldichte verdünnt. Zur weiteren Vorbereitung wurde jede Zellsuspension in einen Thermostaten mit konstanter Temperatur gebracht und vor Versuchsbeginn auf ihre Kopulationsfähigkeit getestet.

Gut bewegliche Zellen beider Geschlechter wurden im Dunkeln auf einem Objektträger gemischt und die Suspension unter dem Binokular mit einer Mikroskopierlampe (30-Watt-Metallfadenbirne, Abstand 30 cm) beleuchtet. Die von Beginn der Belichtung bis zum Einsetzen der Gruppenbildung gemessene Zeit, diente als Kriterium für die Reaktionsfähigkeit der Zellen. Je nach der Fragestellung wurden gut (Reaktionszeit < 5 min), oder schlecht (Belichtungszeit $\gg$ 5 min) reagierende Suspensionen für die Experimente ausgewählt.

Der Gaswechsel wurde nach den bekannten manometrischen Methoden im WARBURG-Apparat gemessen.

Durch Belüften der Zellsuspensionen mit verschiedenen Gasen in Gaswaschflaschen oder Manometriegefäßen wurde die Wirkung der atmosphärischen Zusammensetzung auf die Sexualität geprüft.

Monochromatisches Licht wurde aus dem weißen Licht einer 500-Watt-Kinolampe oder der Quecksilberfadenlampe HBO 200 durch Farbgläser und Interferenzfilterscheiben von SCHOTT isoliert.

Zum Ausschalten der Wärmestrahlung dienten 5 cm Wasser und 5 cm 0,8 % — 8 % CuSO_4 -Lösung.

Die Lichtintensität wurde bolometrisch, die Lichtabsorption mit der ULBRICHTschen Kugel gemessen [WARBURG (9)].

Nachdem die Zellen mit dem anderen Geschlecht im Verhältnis 2 : 1 gemischt und bei 14° C zwei Stunden lang zum Kopulieren dunkelgestellt worden waren, wurden sie mit LUGOLscher Lösung fixiert. Hierauf wurde das Verhältnis von etwa 1000 Einzelzellen zur Zahl der induzierten Pärchen ausgezählt. Dies gab das Maß für die Zahl der induzierten Gameten [FÖRSTER (6)]. Da die ♀♀ mit den ♂♂ im Verhältnis 2 : 1 gemischt waren, errechnete sich der Bruchteil der induzierten ♂♂-Gameten G nach:

$$G = \frac{\text{gezählte Paare}}{\frac{1}{3} \text{ Gesamtzahl der gezählten Zellen}}.$$

3. Beschreibung der Versuche und deren Ergebnisse

A. Differenzierung zweier Lichtwirkungen.

Die sexuelle Reaktionsfähigkeit verschiedener Zellsuspensionen ist trotz gleicher Behandlung oft unterschiedlich. Vermutlich wird die Kopulationsfähigkeit durch bisher unbekannte Kulturfaktoren stark beeinflusst.

In der Regel genügen wenige Minuten Licht (< 5 min) zum Auslösen der Sexualität. Es gibt aber auch Suspensionen, die nach kurzem Belichten wenig Aktivität zeigen, durch längeres und stärkeres Belichten in ihrer Reaktionsfähigkeit jedoch erheblich verbessert werden können. Man kann vermuten, daß die Aufbesserung schlecht reaktionsfähigen Materials durch langes Belichten mit hoher Intensität nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ von der auslösenden Lichtwirkung kleiner Lichtdosen verschieden ist.

Für die Wirkung der großen Lichtmengen kann die Hypothese, daß das Licht über die Photosynthese wirkt, durchaus zutreffen; denn es ist selbstverständlich, daß ein autotropher Organismus in allen seinen physiologischen Vorgängen stark von der Photosynthese abhängt.

Tabelle 2 zeigt uns Absorptionswerte verschiedener Wellenlängen für eine *eugametos*-Suspension von der Flächendichte 1 emm/qcm, bezogen auf die Wellenlänge $\lambda = 436 \text{ m}\mu$.

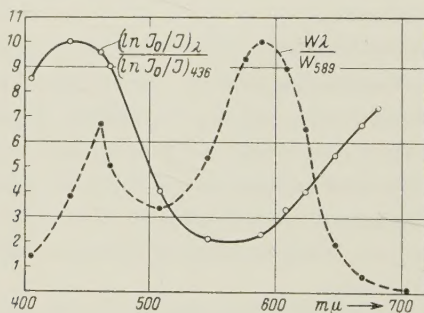


Abb. 1. Absorptionsspektrum und Wirkungsspektrum der Kopulation. Die ausgezogene Kurve ist das Absorptionsspektrum einer Zellsuspension, gemessen mit der ULBRICHTSchen Kugel, bezogen auf $\lambda = 436 \text{ m}\mu$. Die gestrichelte Kurve zeigt das Wirkungsspektrum für die Kopulation nach FÖRSTER.

Abb. 1 veranschaulicht das Absorptionsspektrum lebender *eugametos*-Zellen, das mit der ULBRICHTSchen Kugel bestimmt wurde und das Quantenwirkungsspektrum für die Kopulation nach FÖRSTER (6). Nach allen bisherigen Kenntnissen ist die Photosynthese im Bereich roten und gelben Lichtes der Zellabsorption proportional. Die größte Differenz zwischen den

beiden Spektren liegt aber gerade im Gelb bis Rot: Um $680\text{ m}\mu$ hat das Absorptionsspektrum ein Maximum, während die gleiche Wellenlänge praktisch keine Kopulation mehr auslösen kann. Umgekehrt liegt das Maximum des Wirkungsspektrums um $590\text{ m}\mu$, also in einem Bereich, in dem die Zellen nur schwach absorbieren. Wenn durch CO_2 -Assimilation die Kopulationsbereitschaft verbessert werden kann, so muß sich dies durch Belichten mit den Wellenlängen $680\text{ m}\mu$ und $590\text{ m}\mu$ in geeigneter Versuchsanordnung nachweisen lassen.

Tabelle 2

Wellenlänge ($\text{m}\mu$)	$\left(\frac{\ln I_0}{\ln I}\right)_\lambda : \left(\frac{\ln I_0}{\ln I}\right)_{436}$
405	0,85
436	1,00
461	0,96
468	0,90
508	0,40
546	0,21
589	0,23
608	0,33
624	0,40
647	0,54
668	0,67
681	0,74

Suspensionen von Dunkelzellen wurden geteilt und der eine Teil mit dem sexuell fast unwirksamen Licht von $\lambda = 680\text{ m}\mu$, bei 21°C 180 Minuten lang mit $65 \times 10^{-5}\text{ cal/sec}$ belichtet. Anschließend wurden die Suspensionen 30 Minuten zum Rückreagieren der induzierten Gameten dunkelgestellt. Dann wurde die Sexualität mit dem Licht $\lambda = 589\text{ m}\mu$ ausgelöst. Zur Kontrolle wurden nicht mit Rotlicht vorbehandelte Zellen ebenfalls durch $\lambda = 589\text{ m}\mu$ aktiviert.

Tabelle 3

Bruchteil aktivierter Gameten

Nr.	nach der Vorbelichtung mit $681\text{ m}\mu$	nach der Auslösung d. Sex. mit $589\text{ m}\mu$ nach Vorbelichtung	nach der Auslösung d. Sex. mit $589\text{ m}\mu$ ohne Vorbelichtung
1	0,12	0,53	0,28
2	0,22	0,70	0,47
3	0,09	0,18	0,19
4	0,30	0,83	0,82

In Tabelle III sind vier Versuche mit verschiedenen Ergebnissen zusammengefaßt.

Die Vorbelichtung mit $\lambda = 681 \text{ m}\mu$ hat bei schlecht reaktionsfähigen Zellen oft deren sexuelle Potenz verbessert (Versuche Nr. 1 und 2); große sexuelle Aktivität wurde dagegen durch $\lambda = 681 \text{ m}\mu$ nicht gebildet. Die Verbesserung der sexuellen Potenz erschien erst durch das nachträgliche Belichten mit dem auslösenden Gelblicht von $589 \text{ m}\mu$. Damit sind durch die Variation der Wellenlänge zwei verschiedene Lichtwirkungen differenziert.

Bei gut reaktionsfähigem Material ist in der gleichen Versuchsanordnung keine merkliche Förderung der Potenz durch längeres Belichten mit langwelligem Rot zu finden (Versuch Nr. 4). Nur dann, wenn das Material in seiner Reaktionsfähigkeit deutlich gehemmt war, trat oft, aber nicht immer (Versuch Nr. 3), die beschriebene Förderung ein. Welche Hemmungen durch längeres Belichten aufgehoben werden können, läßt sich nicht sagen. In den Versuchen wurde die Sexualität nicht durch kontrollierte Bedingungen gehemmt, sondern jeweils schlecht reagierende Zellsuspensionen verwendet. Ob speziell die Hemmung durch Nitrat in Analogie zu SAGER und GRANICK durch CO_2 -Assimilation aufgehoben werden kann, wurde nicht näher untersucht, ist aber theoretisch zu erwarten. Die Hemmung durch die Ammoniumsalze konnte dagegen auf diesem Wege nicht beseitigt werden. Diese Ammoniumhemmung ist nach Tabelle 1 am stärksten ausgeprägt und nahezu irreversibel. Sie führt zu Schäden in der Zellteilung und zu Deformationen der Geißeln, wie Kulturversuche mit Ammoniumsalzen als Stickstoffquelle bewiesen haben.

Das Ergebnis der verschiedenen Versuche ist:

a) Durch Photosynthese kann die sexuelle Potenz der Zellen verbessert werden.

b) Es gibt eine andere Lichtwirkung, die speziell die Zellen sexuell aktiviert. Durch dieses Licht kann nicht nennenswert CO_2 assimiliert werden; denn es war 1. der Absorptionskoeffizient λ_{589} der Zellsuspension, 2. die Lichtintensität und 3. die Belichtungszeit sehr klein gegenüber den entsprechenden Werten im langwelligem Rot von $\lambda = 681 \text{ m}\mu$.

Daß Licht von $681 \text{ m}\mu$ tatsächlich über die CO_2 -Assimilation wirkt, läßt sich nachweisen, wenn man sexuell schlecht reagierenden Zellen während der Belichtung das CO_2 entzieht. Unter CO_2 -Ausschluß wurde trotz Belichtens mit $681 \text{ m}\mu$ die sexuelle Potenz der Zellen nicht verbessert.

B. Die Abhängigkeit der Kopulationsfähigkeit vom Sauerstoff

Andere Versuchsserien sollten über die Zusammenhänge zwischen sexualphysiologischen Prozessen und der Zellatmung Aufschluß geben.

Das einzige Experiment auf diesem Gebiet hat bisher LEWIN an *moe-wusi* gemacht. Er fand, daß sexuell aktive Gameten bedeutend schneller zurückreagieren, wenn man ihnen nicht nur das Licht, sondern Licht und Sauerstoff wegnimmt.

Die folgenden Versuche sollen die Abhängigkeit der Gametogenese vom Sauerstoff in einigen Einzelheiten erklären. Das Hauptgewicht liegt bei den Versuchen naturgemäß auf der Frage, ob der Einfluß des Sauerstoffes auf die sexualphysiologischen Vorgänge geschlechtsspezifisch ist, oder nicht.

1. a) Die Wirkung des Sauerstoffes auf die Kopulationsfähigkeit der ♂♂.

Die Zellen werden in Manometriegefäße gebracht. In den Gasraum wurde Argon bzw. 0,05 % CO₂ in Argon eingeleitet. Um die restlichen Spuren von Sauerstoff, die in käuflichen Gasen enthalten sind, zu eliminieren, wurden die Schwärmer vor Beginn der Belichtungsversuche 30 bis 60 Minuten zum Veratmen dieser Spuren im Manometriegefäß dunkel gehalten. Die Vollständigkeit der Anaerobiose wurde auf folgendem Wege geprüft:

In den Einsatz des Manometriegefäßes kam zur Absorption der Atmungs- und Gärungskohlensäure 20 % KOH. Ist die Anaerobiose vollständig, so dürfen keine negativen Drucke mehr auftreten, die die Aufnahme von Sauerstoff anzeigen. Als Komplikation traten unter anaeroben Bedingungen trotz Kalilauge im Einsatz kleine positive Drucke auf, die eventuell eine noch vorhandene Atmung durch Kompensation verdecken konnten. Nun ist von verschiedenen autotrophen Organismen bekannt, daß sie unter anaeroben Bedingungen Wasserstoff erzeugen. In Manometrieversuchen muß sich diese H₂-Produktion als positive Druckänderung bemerkbar machen. Daher lag die Vermutung nahe, daß auch *Chlam. eugametos* in der Anaerobiose Wasserstoff produziert, die beobachteten positiven Drucke also von einer derartigen H₂-Erzeugung herrühren. Durch Adsorption des Wasserstoffes an Palladiumasbest konnte man das Auftreten dieser Druckänderungen verhindern. Erst wenn sowohl Kalilauge als auch Palladiumasbest im Gefäß vorhanden waren, verschwanden einige Zeit nach dem Einleiten des Argons alle Druckänderungen. Das war das Kriterium für die Vollständigkeit der Anaerobiose.

Ohne Ausnahme war die Kopulation nach Sauerstoffentzug total gehemmt. Belichtung mit beliebigen Wellenlängen, beliebigen Intensitäten und von beliebiger Dauer induzierte nie Gameten. Wurden die anaerob gehaltenen ♂♂ belichtet und nach der Belichtung in Luft mit ♀♀ gemischt, so traten keine Gruppen auf, während die aerob belichteten Kontrollen des gleichen Materials sofort starke Gruppenbildung zeigten. Diese Hemmung war reversibel: Wurde nach der Anaerobiose das O₂-freie Gasmisch durch

Luft ersetzt und wurden die Zellen weiter belichtet, so wurden sie bei den sonst übliche Zeiten und Intensitäten sexuell aktiv. Bei unvollständiger Anaerobiose war auch die Hemmung der Gameteninduktion unvollständig. Daher war es immer notwendig, auf Vollständigkeit der Anaerobiose zu prüfen. Während das vollkommene Entziehen von Sauerstoff die Kopulation vollständig aufhebt, ist ein Herabsetzen des Sauerstoffpartialdruckes der Luft von 21 % bis zu 3 % ohne jeden Einfluß. In einem Versuch erhielt man von der gleichen Suspension bei

21 % O ₂	36 % Gameten und bei
3 % O ₂	35 % Gameten.

Sauerstoffpartialdrucke unter 3 % wurden nicht systematisch geprüft.

Man muß daraus schließen, daß die Biosynthese der Gamone, speziell der photochemische Prozeß, der die sexuelle Aktivität auslöst, mit einem Atmungsvorgang eng gekoppelt ist. Entzieht man umgekehrt im Licht voll aktivierten Gameten den Sauerstoff, so verlieren sie trotz weiterer Belichtung ihre Aktivität nach einiger Zeit ganz, wie folgender Versuch zeigt:

Von einer ♂♂-Suspension, die in einem Manometriegefäß belichtet worden war, ergab eine Probe nach dem Mischen mit ♀♀ 59 % Gameten. Dann wurde die Luft durch Argon verdrängt und konstant weiter belichtet. Eine nach einer Stunde entnommene Probe zeigte nach dem Mischen mit ♀♀ keine Gruppenbildung mehr; die 59 % aktivierten Gameten waren nach einer Stunde Anaerobiose quantitativ zurückreagiert. Erst nach einigen Minuten Luftzutritt setzte die Gruppenbildung ein.

Der genaue Verlauf der Rückreaktion bei Sauerstoffentzug wurde nicht experimentell bestimmt.

I. b) Eine lichtinduzierte Atmung.

Im folgenden sollen einige Versuche angeführt werden, die bisher allerdings nicht an jedem Material und unter allen Bedingungen zu reproduzieren waren. Die Bedingungen ihrer Reproduzierbarkeit erfordern noch systematische Untersuchungen. Sie sind aber für die Deutung der spezifischen Lichtwirkung wichtig. ♂♂-Zellen wurden in schwarzen ERLÉNMEYER-Kolben suspendiert. Nachdem sie voll beweglich waren, wurde ihre Atmung im Dunkeln manometrisch gemessen. Nach Belichten mit mittleren Intensitäten von $\lambda = 589 \text{ m}\mu$ steigerte sich die Atmung in einigen Fällen, um nach ungefähr 10–15 Minuten trotz der Belichtung wieder auf den normalen Wert abzusinken (vgl. Protokoll).

An dem gleichen Material wirkte rotes Licht der Wellenlänge $668 \text{ m}\mu$, das für die Kopulationsauslösung nur $\frac{1}{20}$ der Wirkung von Licht der

Wellenlänge $589\text{ m}\mu$ hat, umgekehrt: Die den O_2 -Verbrauch anzeigenden negativen Drucke wurden kleiner, die Atmung also durch Photosynthese kompensiert.

Diese Versuche zeigen, daß Zellen, die mit Licht der Wellenlänge $589\text{ m}\mu$ aktiviert werden, kurzfristig etwas mehr Sauerstoff verbrauchen. Es ist bemerkenswert, daß die erhöhte Atmung nur kurzfristig auftritt und die nach der Belichtung sexuell aktiven Gameten nicht mehr Sauerstoff verbrauchen, als die vor der Belichtung noch asexuellen Schwärmer. Die unterschiedliche Sauerstoffaufnahme hat also nichts mit dem Unterschied asexueller Schwärmer — Gamet zu tun. Bei der Belichtung mit $\lambda = 589\text{ m}\mu$ ist die Atmungssteigerung nur vorübergehend, während die Zellen weiterhin sexuell aktiv bleiben.

Protokoll

Gefäßvolumen 13,7 ccm
 Hauptraum 4,0 ccm ♂♂-Suspension (60 cmm Zellen)
 Einsatz 0,3 ccm 20% KOH
 Temperatur 18°C
 pH 6

Minuten	Belichtung	Druckänderung (mm)
5	dunkel	— 4,0
5	"	— 4,5
5	"	— 5,0
5	"	— 4,0
5	$589\text{ m}\mu\ 16 \times 10^{-5}\text{ (cal/sec)}$	— 7,0
5	"	— 7,0
5	"	— 5,0
5	"	— 4,0
5	"	— 4,0
5	"	3,5
5	"	— 4,0
5	dunkel	— 3,5
5	"	— 5,0
5	"	— 4,0
5	"	— 4,0
5	"	— 4,0
5	$668\text{ m}\mu/16 \times 10^{-5}\text{ (cal/sec)}$	— 4,0
5	"	3,5
5	"	— 3,5
5	"	— 3,0
5	"	— 4,0
5	"	— 3,5
5	"	3,5

Der Atmungsanstieg trat mitunter auch auf, wenn die Zellen statt in der angegebenen Versuchslösung in einer konzentrierteren Salzlösung suspendiert waren, die die Kopulationsfähigkeit hemmt. Auch hier ergab sich immer der charakteristische Unterschied, daß von den beiden geprüften Wellenlängen 589 $m\mu$ und 668 $m\mu$ die Atmungssteigerung nur bei 589 $m\mu$ auftrat. Es scheint daher, daß die lichtinduzierte Atmung bei $\lambda = 589 m\mu$ nicht eine Folge der sexuellen Aktivierung ist. Möglich bleibt aber, daß umgekehrt die sexuelle Aktivierung durch Licht eine Folge dieser induzierten Atmung ist.

Die Tatsache, daß der Effekt nicht immer zu reproduzieren ist, kann evtl. einfach dadurch erklärt werden, daß die lichtinduzierte Atmung über einen anderen fermentativen Weg geht, als die normale Zellatmung. Da die Zellen vor der Belichtung immer mindestens 12 Stunden dunkel gestanden haben, also keinen neuen Energievorrat durch Photosynthese schaffen konnten, ist es möglich, daß die Brennstoffe der Zelle für die gesamte Atmung begrenzend sind und die lichtinduzierte Atmung auf Kosten der normalen Zellatmung abläuft. Manometrisch wäre dann keine zusätzliche O_2 -Aufnahme zu bemerken. Wie dem nun auch sein mag, für das sexualphysiologische Problem bleibt der enge Zusammenhang zwischen Lichtbedarf und Sauerstoffbedarf bestehen. Die Tatsache, daß gerade gelbes Licht der maximalen sexuellen Wirkung mitunter eine zusätzliche Atmung induziert, kann sehr wohl einen ursächlichen Zusammenhang haben. Erwiesen ist er nicht. Die enge Kopplung zwischen Licht- und Sauerstoffbedarf bei den ♂♂ wird noch unterstrichen durch die Tatsache, daß die lichtunabhängigen ♀♀ von der Anwesenheit des Sauerstoffes in einem gewissen Maße unabhängig sind. Das belegen die folgenden Versuche.

II. Der Einfluß des Sauerstoffes auf die Kopulationsfähigkeit der ♂♂.

Wird eine noch kopulationsunfähige Suspension von ♀♀-Schwärmern unter anaerobe Bedingungen gebracht und nach einiger Zeit im Gruppenbildungstest auf ihre Reaktionsfähigkeit geprüft, so tritt meist sofort Gruppenbildung in der gleichen Stärke wie bei der aeroben Kontrolle auf. Läßt man die Suspension längere Zeit — etwa 2 bis 4 Stunden — anaerob, so geht die Reaktionsfähigkeit der Zellen im Gruppenbildungstest stark zurück. Prinzipiell aber können asexuelle ♀♀-Schwärmer anaerob sexuell aktiv werden und über einige Stunden sexuell aktiv bleiben. Prüft man nach 24 Stunden Anaerobiose die Gamonabgabe der Zellen an das Medium, so findet sich in den Filtraten praktisch keine nachweisbare Gamonaktivität, auch wenn die Kontrolle in Luft die üblichen Aktivitäten mit einer Ver-

dünnungsgrenze von 1:20 bis 1:40 abgegeben hat. Unter anaeroben Bedingungen ist die Produktion der Gamone also stark herabgesetzt. Die Menge des gebildeten Gamons kann zwar noch für die Kopulation ausreichen, aber es wird kein Überschuß mehr produziert, der an das Medium abgegeben und im Filtrat nachgewiesen werden kann.

Der Umstand, daß die ♀♀ anaerob in begrenztem Maße sexuell aktiv bleiben können, ermöglicht es, die hemmende Wirkung der Anaerobiose auf die ♂♂ quantitativ im Pärchentest zu prüfen. (Die bisher an ♂♂ beschriebenen Versuche waren rein qualitative Tests auf Gruppenbildung.) Vollaktivierte ♀♀ und asexuelle ♂♂-Schwärmer wurden im Dunkeln und anaerob zusammengebracht. Danach wurde belichtet. Es kam nie zur Bildung von Pärchen, wenn die Zellen bis zum Fixieren anaerob blieben.

Die normale Atmung der Zellen beider Geschlechter wurde nach den üblichen Methoden mit Kalilauge im Einsatz des Manometriegefäßes bestimmt. Sie ist bei beiden Geschlechtern verschieden groß, je nach dem Salzgehalt der verwendeten Meßlösung. Sie ist am kleinsten in aqua dest. bzw. in sehr verdünnten Lösungen, wie es u. a. die Versuchslösung ist. Sie stieg bei beiden Geschlechtern in konzentrierten Lösungen (Gesamtsalzgehalt etwa 1%) auf mehr als das Doppelte. Immer bleibt aber bei vergleichbaren Meßlösungen die Atmung der ♂♂ kleiner als die Atmung der ♀♀, der Quotient

$$\frac{Q_{O_2} \text{ aufgenommen } \sigma\sigma}{Q_{O_2} \text{ aufgenommen } \varphi\varphi} \approx 0,6.$$

In aqua dest. verbraucht 1 cmm ♂♂ im Durchschnitt 1 cmm O_2 /h. Die ♀♀ verbrauchen pro Stunde rund 1,5 cmm O_2 /cmm Zellen. In konzentrierten Nährsalzlösungen verbrauchen 1 cmm ♂♂-Zellen im Durchschnitt 1,8 cmm O_2 /h, die ♀♀ dagegen 2,8 cm. Die Werte schwanken von Versuch zu Versuch. Bei gleicher Anzucht und gleicher Meßlösung findet man aber immer mit überraschend guter Näherung das Verhältnis $Q_{O_2} \sigma\sigma : Q_{O_2} \varphi\varphi = 0,6$.

C. Der Einfluß der Kohlensäure auf die spezifische Lichtwirkung zur Auslösung der Sexualität von *eugametos*-♂♂

Die bisher beschriebenen Versuche haben ergeben, daß die Kopulationsfähigkeit in starkem Maße von der Atmung abhängt und außerdem von der Photosynthese beeinflusst werden kann. Insbesondere ist die spezifische Lichtwirkung bei den ♂♂ unmittelbar mit einem Atmungsvorgang verknüpft.

Die folgenden Versuche sollen zeigen, daß diese spezifische Lichtwirkung nicht nur von der Anwesenheit des Sauerstoffes abhängt, sondern darüber hinaus durch Kohlensäure beeinflusst wird.

Die Zellsuspensionen wurden im Thermostaten bei 20° C über Nacht dunkel gestellt. Die Zelldichte war 4 cmm/ccm. Jeweils 5 ccm der Suspension wurden im Dunkeln in ein Manometriegefäß pipettiert und im WARBURG-Apparat bei 20° C geschüttelt. In den Einsatz des Gefäßes kamen 0,4 ccm 20 % KOH, um die Atmungskohlensäure zu absorbieren. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 180 min⁻¹ geschüttelt und nach dem Schließen der Hähne belichtet. Zur Kontrolle diente ein zweites, unter gleichen Bedingungen belichtetes Gefäß mit Luft, aber ohne KOH im Einsatz. Außerdem wurden stets auch unbelichtete ♂♂ mit ♀♀ zur Kopulation gebracht (Dunkelprobe). Die Ergebnisse einiger Versuchsreihen sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Die Versuche Nr. 1—7 wurden mit kurzen Belichtungszeiten und niedrigen Intensitäten für verschiedene Wellenlängen durchgeführt. Sie zeigen ausnahmslos eine Förderung der Kopulationsfähigkeit nach CO₂-Entzug (Vergleichszahl < 1).

Die Versuche 8—10 lassen erkennen, daß umgekehrt bei hohen Intensitäten und langen Belichtungszeiten die erhaltenen Werte in Luft mit CO₂ größer sind, als in Luft ohne CO₂ (Vergleichszahl > 1).

Diese Versuche wurden an verschiedenen Tagen und an individuell verschiedenem Material wiederholt. Um besser vergleichbare Werte zu bekommen, wurde gleiches Material am selben Tag mit konstanter Wellenlänge, aber unterschiedlichen Intensitäten oder Zeiten belichtet.

Nr. 11 und 12 zeigen das Ergebnis eines dieser Versuche. Bei kleinen Lichtmengen wirkte CO₂-Entzug fördernd gegenüber Luft mit CO₂, bei größeren Lichtmengen dagegen hemmend.

Bei der fördernden Wirkung durch Kohlensäureentzug könnte man an eine triviale Erklärung denken:

Entfernt man nämlich die Kohlensäure aus der ungepufferten Versuchslösung, so steigt deren pH. In schwach alkalischen Lösungen ist aber nach den Erfahrungen von FÖRSTER und WIESE und von R. A. LEWIN die sexuelle Reaktionsfähigkeit der Zellen besser.

Leider läßt sich dieser Effekt der pH-Änderung nicht ausschalten. Man würde dazu puffernde Salze in einer Konzentration brauchen, die gemäß Tabelle 1 die Kopulationsfähigkeit unterdrücken.

Um die Abhängigkeit der Kopulationsfähigkeit vom pH quantitativ nachzuweisen, wurde das primäre Phosphat der Versuchslösung in anderen Versuchen durch eine äquimolare Menge des sekundären Phosphates ersetzt. Dadurch war die Lösung zwar nicht auf ein bestimmtes pH gepuffert, aber immerhin ein deutlicher Unterschied in der H-Ionenkonzentration erreicht. Bei Versuchen mit beiden Medien ergab sich ausnahmslos eine höhere Gametenzahl in der Lösung mit höherem pH.

Im Folgenden sei ein Zahlenbeispiel zur Verdeutlichung gegeben:

NaH_2PO_4 $0,7 \times 10^{-3}$ mol 461 m μ $3,2 \times 10^{-5}$ cal/sec 10' 50 % Gam.
 Na_2HPO_4 $0,7 \times 10^{-3}$ mol 461 m μ $3,2 \times 10^{-5}$ cal/sec 10' 62 % Gam.

Demnach könnte die Förderung durch CO_2 -Wegnahme bei kurzen Belichtungszeiten unter Umständen nur ein pH-Effekt sein. Unerklärt bleibt aber damit die Änderung der Vergleichszahl mit der Wellenlänge. Sie ist, wenn auch nicht quantitativ, so doch gleichsinnig reproduzierbar, wie es

Tabelle 4

Nr.	Datum	Zeit [min]	Licht- intensität [cal/sec $\times 10^{-5}$]	W'länge [m μ]	CO_2	Bruchteil akti- vierter Gameten	Vgl.- Zahl
1	15. 5.	5	5,3	436	+	0,17	0,53
					—	0,32	
2		10	3,5	468	+	0,28	
					—	0,45	
3		10	5,3	546	+	0,15	
					—	0,36	0,42
4		10	3,2	589	+	0,50	0,96
					—	0,52	
5		10	5,3	649	+	0,21	
					—	0,34	
6		10	3,2	461	+	0,30	
	17. 5.				—	0,33	0,91
7		10	3,2	589	+	0,34	
					—	0,41	
8	20. 5.	20	16,0	461	+	0,65	1,14
					—	0,57	
9		20	16,0	589	+	0,77	
	25. 5.				—	0,70	1,10
10		60	320,0	weiß	+	0,52	
					—	0,32	
11	26. 5.	5	32,0	589	+	0,68	1,20
					—	0,57	
12	26. 5.	5	3,2	589	+	0,32	0,72
					—	0,44	

Der Einfluß des Kohlendioxyds auf die Kopulation bei großen und kleinen Licht-
erhaltener Wert in Luft
intensitäten. Die Vergleichszahlen geben die Verhältnisse $\frac{\text{erhaltener Wert in Luft}}{\text{erhaltener Wert in Luft} - \text{CO}_2}$
für die verschiedenen Versuche wieder.

die Protokollauszüge der Tabelle IV (Nr. 1—7) zeigen. Sie ist bei großen Wirkungsstärken (vgl. Abb. 1), z. B. 461 m μ und 589 m μ immer größer als bei kleinen, z. B. 436 m μ , 546 m μ und 649 m μ .

Diese charakteristische Abhängigkeit des CO₂-Einflusses von der Wellenlänge des spezifischen Lichtes verlangt eine andere Erklärung.

Wie die Tabelle 4 zeigt, wirkt bei großen Lichtdosen die Anwesenheit von CO₂ relativ fördernd. Denkt man an die zuerst beschriebenen Versuche über die Differenzierung zweier Lichtwirkungen (Verbesserung der sexuellen Potenz durch Photosynthese und spezifische Auslösung der Sexualität), so wäre es zunächst naheliegend anzunehmen, daß diese Förderung bei höheren Lichtmengen und Anwesenheit von CO₂ ihre Ursache ausschließlich in der Verbesserung der sexuellen Potenz durch Photosynthese hat. In Wirklichkeit kann diese Annahme den Sachverhalt aber nur teilweise erklären. Drei Umstände sprechen dagegen:

1. Merkwürdigerweise hemmen höhere CO₂-Partialdrucke die Kopulation immer. Das belegen die folgenden Zahlen von einigen Versuchen:

Atmosphäre: Etwa 5 % CO₂ in Luft.

— CO ₂	588 m μ	$3,2 \times 10^{-5}$ cal/sec	20'	47 %	Gameten
+ CO ₂				21 %	
— CO ₂			10'	39 %	
+ CO ₂				15 %	

Wenn der beschriebene Effekt bei Anwesenheit von CO₂ und relativ hohen Intensitäten und längeren Belichtungszeiten die sexuelle Potenz durch Photosynthese verbessert, so hätte man erwarten müssen, daß bei 5 % CO₂ in Luft die Förderung noch größer ist, da 5 % CO₂ in Luft der optimale CO₂-Partialdruck für die Photosynthese ist. Das Gegenteil aber war der Fall.

2. Ein zweiter Grund gegen eine solche Annahme ist die Tatsache, daß auch optimal reagierende Zellen zu diesen Versuchen verwendet wurden, deren sexuelle Potenz durch Photosynthese nicht zu verbessern war (Tabelle 3, Versuch 4 und S. 370).

Die folgende Gruppe von Versuchen beweist endgültig, daß diese Annahme zur Erklärung nicht ausreicht, sondern daß die Wirkung der Kohlensäure unmittelbar mit der spezifischen Lichtwirkung verknüpft ist.

Gameten von *eugametos*-♂♂ und *moewusi* verlieren ihre Kopulationsfähigkeit im Dunkeln sehr schnell. Die Frage war, ob aktivierte Gameten trotz weiteren Belichtens durch CO₂-Entzug ihre Aktivität verlieren, bzw. sich bei verschiedenen Intensitäten verschieden verhalten, ähnlich wie bei der Lichtaktivierung mit und ohne CO₂.

Die Zellen einer Suspension wurden zunächst zur sexuellen Aktivierung 1—2 Stunden in Luft (mit verschiedenen Intensitäten und verschiedenen Wellenlängen) belichtet, und die danach sexuell aktive Suspension geteilt. Der eine Teil blieb in Luft, während dem anderen das CO_2 durch zwei Vorlagen mit KOH und einer Vorlage mit Barytwasser entzogen bzw., wenn Manometriegefäße zu den Versuchen benutzt wurden, Kalilauge in den Einsatz gegeben wurde. Beide Teile erhielten kontinuierlich weiter Licht. In bestimmten Zeitabständen wurden die Zellen der beiden Teilsuspensionen im Dunkeln und in Luft mit ♀♀ zur Kopulation gebracht. Immer nahm trotz der Belichtung die Zahl der Gameten nach CO_2 -Entzug ab.

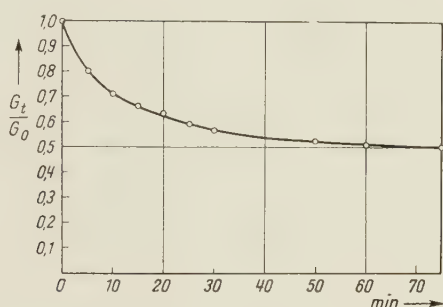


Abb. 2. Rückreaktion von ♂♂-Gameten nach CO_2 -Entzug.

Die Punkte der Abb. 2 ergeben sich aus den Mittelwerten von vier verschiedenen Versuchen. Immer ging die Aktivität im Laufe einer Stunde auf den halben Wert zurück, um dann auf diesem Niveau zu bleiben; bei der gleichen Temperatur von 20°C beobachteten FÖRSTER und LEWIN nach Dunkellstellen ein exponentielles Zurückreagieren bis zur nahezu vollständigen Kopulationsunfähigkeit mit einer Halbwertszeit von etwa 10 Minuten.

Diese Rückreaktion nach CO_2 -Wegnahme tritt bei großen und bei kleinen Intensitäten ein. Man kann hier nicht annehmen, daß die Potenz der Zellen schlechter geworden wäre, weil sie keine Photosynthese machen konnten. Denn im Dunkeln bleibt die Potenz der Zellen unter kontrollierten Bedingungen während einiger Stunden in der Regel konstant. Diese Konstanz der Potenz von Zellen im Dunkeln ist die Voraussetzung für die meisten Versuche. Fügt man den Zellen, die durch CO_2 -Fortnahme in ihrer Kopulationsbereitschaft herabgesetzt sind, das CO_2 wieder zu, so steigt die Kopulationsfähigkeit in wenigen Minuten wieder auf den Ausgangswert.

Es scheint zwar ein Widerspruch zu sein, daß die Gameten auch bei kleinen Intensitäten nach CO_2 -Entzug sofort zurückreagieren, während sie

doch ohne CO_2 bei kleinen Intensitäten sogar besser aktiviert werden können. Diese Experimente wurden daher oft wiederholt. Das Ergebnis blieb immer gleich.

Die Lösung des Widerspruches ergab sich durch Experimente, in denen der zeitliche Verlauf der Lichtaktivierung bei kleinen Intensitäten und CO_2 -Ausschluß verfolgt wurde. Die Zahl der Gameten durchläuft dabei ein Maximum, um dann auf einen Teil des Maximalwertes abzusinken, während die Kontrolle in Luft konstant auf dem maximalen Wert bleibt (Abb. 3).

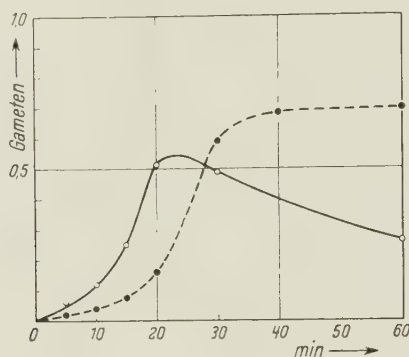


Abb. 3. Zeitlicher Verlauf der sexuellen Aktivierung mit und ohne CO_2 . — — — mit CO_2 , ——— ohne CO_2

Tabelle 5

$$I = 9 \times 10^{-5} \text{ [cal/sec]}$$

$$t^\circ = 18^\circ \text{ C}$$

$$d\sigma\sigma = 10 \text{ [mm}^3/\text{cm}^3]$$

$$\lambda = 541 \text{ [m}\mu\text{]}$$

$$\text{Vorlage: 30\% KOH}$$

$$d\varphi\varphi = 20 \text{ [mm}^3/\text{cm}^3]$$

Zeit (in min)	Bruchteil aktivierter Gameten
0 (Dunkelprobe)	0,0
5	0,06
10	0,12
15	0,25
20	0,51
30	0,49
60	0,26

D. Die Wirkung von Licht und Kohlensäure auf die Kopulationsfähigkeit der ♀♀

Die Wirkung von Licht und CO_2 auf die Kopulationsfähigkeit von *Chlam. eugametos* war bei den ♂♂ mit dem Pärchentest quantitativ immer gut zu erfassen. Die Lichtabhängigkeit der ♂♂ erlaubt es, sie während der Belichtung verschiedenen Atmosphären auszusetzen und sie im Anschluß daran in Luft, aber ohne Licht kopulieren zu lassen; nach dem Verdunkeln können durch Änderung der Atmosphäre keine Gameten mehr induziert werden. So bestimmen lediglich die verschiedenen Manipulationen im Licht die Differenz der Ergebnisse.

Die ♂♂ brauchen zum Auslösen der Kopulationsbereitschaft kein Licht. Bei ihnen läßt sich daher auf diesem Weg der Einfluß der atmosphärischen Zusammensetzung auf die Sexualität quantitativ nicht prüfen. Da man sie nach den Versuchen unter variierten Bedingungen immer mit ♂♂ in Luft kopulieren lassen muß, verschwinden eventuelle, durch die Zusammensetzung der Atmosphäre bedingte Effekte. Würde man umgekehrt die Kopulation in der variierten Atmosphäre vor sich gehen lassen, so würde der Einfluß dieser Variationen auf die ♂♂ die Wirkung auf die ♀♀ verwischen.

Um aber doch einen Aufschluß über die Wirkung der Kohlensäure auf die Kopulationsfähigkeit der ♀♀ zu bekommen, wurden diese Einflüsse wenigstens qualitativ durch Tests auf Gruppenbildungen und Gamonabgabe geprüft.

Eine ♀♀-Suspension wurde geteilt. Der eine Teil wurde 48 Stunden belichtet, der andere während dieser Zeit dunkel gehalten. Beide Suspensionen wurden in gleichen Zeitabständen auf Gruppenbildung getestet. Trotz gleicher Gruppenbildungsreaktion war die abgegebene Gamonaktivität nach den 48 Stunden im belichteten Gefäß größer, als die im unbelichteten. Das Filtrat des belichteten Gefäßes hatte seine Wirkungsgrenze nach einer Verdünnung von 1 : 45 erreicht, das unbelichtete nach einer Verdünnung von 1 : 30.

Diese Differenz der Wirkungen, die in der produzierten Menge Gamon erfaßt wurde, läßt sich folgendermaßen erklären: Die Zellen produzieren unter günstigen Bedingungen einen erheblichen Überschuß an Gamon, von dem ein geringer Teil für die Kopulation voll ausreichen würde. Man kann daher diesen Überschuß an sexueller Aktivität im Gruppenbildungstest nicht erfassen, da das Maximum kopulationsfähiger Gameten durch die Zahl der Zellen begrenzt ist. Man darf annehmen, daß die Produktion

des Gamonüberschusses vom Energievorrat der Zellen abhängt, der bei 48 Stunden Dunkelheit durch die Atmung aufgebraucht wird, während er im Licht durch die Photosynthese ersetzt werden kann.

Ähnliche Unterschiede in der Gamonabgabe wie zwischen hell und dunkel ergaben sich bei Belichtung der ♀♀ mit und ohne CO₂. Im Dunkeln ist bei den lichtunabhängigen ♂♂ die Wegnahme des CO₂ ohne Einfluß auf die Kopulationsfähigkeit und die Gamonabgabe.

Diese unterschiedlichen Verhältnisse bei ♂♂ und ♀♀ hinsichtlich der CO₂-Wirkung unterstreichen, daß der unerklärte Einfluß der Kohlensäure auf die ♂♂ mit der spezifischen Lichtwirkung in direktem Zusammenhang steht.

Für ♀♀ gilt, daß die höchste Aktivität im Licht bei CO₂-Anwesenheit erhalten wird, also wenn die Zellen assimilieren können. Die Aktivität ist kleiner, wenn die Zellen längere Zeit dunkel gehalten werden, also wenn keine Photosynthese stattfinden und daher auch keine neue chemische Energie gebildet werden kann. Die Aktivität wird sehr klein unter anaeroben Bedingungen, wenn nur so viel an chemischer Energie vorhanden ist, wie dem Energiegewinn durch Gärung entspricht. Durch Gärung werden eben die Brennstoffe der Zelle schlechter ausgenutzt als durch Atmung. Diese rein energetische Deutung der Sauerstoffwirkung bei den Versuchen mit ♀♀ ist am nächstliegenden.

4. Diskussion

Der Aufbau der sexuellen Aktivität beruht auf der Biosynthese der Gamone. Die bei allen Versuchen entscheidende Frage ist, ob sie einen der spezifischen Biosyntheseschritte selbst oder aber stoffwechselphysiologische Vorgänge betreffen, von denen sekundär die Gamonbildung abhängt.

Die Untersuchungen von SAGER und GRANICK, BERNSTEIN und JAHN und Y. Tsubo haben gezeigt, daß das Licht über einen allgemeinen stoffwechselphysiologischen Vorgang, die Photosynthese, die Sexualität beeinflußt.

Im Zuge der Photosynthese wird der im Medium vorhandene Stickstoff assimiliert und der auftretende N-Mangel ist wesentliche Voraussetzung zur sexuellen Aktivierung. Dieses Ergebnis der genannten Autoren bleibt von den beschriebenen Befunden unbeeinflußt und es ist sicher, daß N-Mangel auch für *eugametos* eine der Voraussetzungen für die Sexualität ist.

Die Funktion des Lichtes ist aber damit nicht erschöpft. Die im Prinzip vom Licht unabhängigen *eugametos*-♀♀ werden durch Photosynthese in

ihrer Aktivität verbessert, wobei eine Förderung durch Stickstoffassimilation ausgeschlossen ist. Die benutzten Kulturen waren im Durchschnitt vier Wochen alt und das Versuchsmedium war frei von N-Salzen.

Die wahrscheinliche Deutung für die Förderung der ♀♀ durch Licht ist die Ergänzung des Energievorrates durch die Photosynthese.

Während die Verhältnisse für die Gametogenese und die Gamonproduktion der ♀♀ übersichtlich sind, sind sie bei den ♂♂ durch den zusätzlichen Lichtbedarf kompliziert.

Auch bei den ♂♂ hat die Photosynthese zunächst eine verbessernde Wirkung auf die Kopulationsbereitschaft. Das haben die beschriebenen Versuche mit rotem Licht von $\lambda = 681 \text{ m}\mu$ gezeigt. Daneben gibt es eine andere spezifische Lichtwirkung, die nicht wie die Photosynthese den Aufbau energiereicher Stoffe bewirken kann. Für dieses Licht, bzw. den durch ihn ausgelösten photochemischen Prozeß, bleibt es offen, ob er ein unbekannter allgemein stoffwechselphysiologischer oder spezifisch sexualphysiologischer Vorgang ist.

Betrachtet man *eugametos* isoliert, so ist man zunächst geneigt, daran zu denken, daß die Lichtabhängigkeit der ♂♂ im Gegensatz zur Lichtunabhängigkeit der ♀♀ geschlechtsspezifisch ist. Vergleicht man aber *eugametos* und *moewusi*, so ändert sich das Bild. Bei *moewusi* sind nach LEWIN und eigenen Erfahrungen beide Geschlechter in prinzipiell gleicher Weise lichtabhängig. In schwachem Licht verwandeln sich die vegetativen Schwärmer in Gameten, um nach Lichtwegnahme wieder exponentiell zurückzureagieren. Die Differenzen im Wirkungsspektrum der beiden Arten können methodische Ursachen haben [LEWIN (5), FÖRSTER (6)]. Ist aber die Lichtabhängigkeit nicht geschlechtsspezifisch, so wird auch unwahrscheinlich, daß sie sexualspezifisch ist, wegen der Ausnahme, daß *eugametos*-♀♀ kein Licht brauchen, um sexuell aktiv zu werden. Diese vergleichenden Betrachtungen ließen sich noch auf andere Arten ausdehnen.

Wahrscheinlich bleiben bis jetzt zwei Alternativen, daß nämlich das spezifische Licht einen unbekannten stoffwechselphysiologischen Vorgang auslöst oder einen Regulationsmechanismus steuert, der darüber entscheidet, ob eine Zelle vegetativ oder sexuell ist. Nach der zweiten Hypothese wäre der photochemische Vorgang ein Verbindungsglied zwischen Sexual- und Stoffwechselphysiologie. Von einem solchen Regulationsmechanismus wäre nicht zu verlangen, daß er innerhalb einer Art obligatorisch vorhanden sein muß. Er könnte vielmehr durch mendelnde Gene bedingt sein, die in einem Fall vorhanden sind und im anderen nicht.

Die Tatsache, daß die Wirkung des spezifischen Lichtes obligatorisch an die Anwesenheit von Sauerstoff gebunden ist und durch Kohlensäure erheblich beeinflußt wird, läßt allerdings die erste Hypothese, daß es sich um einen allgemeinen stoffwechselphysiologischen Vorgang unbekannter Natur handelt, wahrscheinlicher erscheinen. Aus der besonders engen Kopplung zwischen dem photochemischen Vorgang und dem sauerstoffverbrauchenden Prozeß muß man schließen, daß beide in ihrem physiologischen Mechanismus eng verknüpft oder identisch sind. Die Kopulationsbereitschaft der *eugametos*-♂♂ ist von Licht und Sauerstoff abhängig und die Lichtwirkung wird durch den Partialdruck des Kohlendioxyds stark beeinflußt. Um diesen Zusammenhang zu verstehen, wird man eine Theorie ersinnen müssen, die allen drei Faktoren (Licht, Sauerstoff und Kohlensäure) gerecht wird.

Durch die neuen Befunde sind eventuell einige Differenzen und Probleme früherer Untersuchungen über die Lichtwirkung bei *eugametos* und *moewusi* teilweise zu erklären.

Bei der Bestimmung des Wirkungsspektrums von *Chlam. eugametos* fand FÖRSTER im Gelb und Rot immer gut reproduzierbare Werte, während im Grün und im Blau unerklärte Schwankungen auftraten. Durch die beschriebenen Versuche, die zwei verschiedene Lichtwirkungen (Photosynthese und spezifisches Licht) differenziert haben und durch den Einfluß des CO₂-Partialdruckes bei der spezifischen Lichtwirkung lassen sich diese Schwankungen erklären: Im langwelligen Bereich des Spektrums fällt das Wirkungsspektrum der Kopulation und das Absorptionsspektrum der Zellen stark auseinander, während sich beide Spektren im kurzwelligen Bereich nahezu decken. Daher kommt es im kurzwelligen Bereich zur Überlagerung verschiedener Lichtwirkungen. Im Gelb gibt es eine solche Überlagerung nicht, da um 590 m μ die Absorption der Zellen sehr klein ist und umgekehrt bei 680 m μ , dem Absorptionsmaximum der Zellen, das Licht keine spezifisch kopulationsauslösende Wirkung mehr hat. Hinzu kommt, daß bei den Versuchen von FÖRSTER der Partialdruck der Kohlensäure nicht konstant gehalten wurde, was für die genaue Bestimmung des Wirkungsspektrums nach den beschriebenen Befunden notwendig wäre.

Da außerdem das Ausgangsmaterial in seiner Potenz großen Schwankungen unterliegt, die von Zuchtbedingungen abhängen, muß man zu der Bestimmung des Wirkungsspektrums des spezifischen Lichtes Material auswählen, das vor Beginn des Belichtungsversuches eine sexuelle Potenz besitzt, die durch Photosynthese nicht mehr gesteigert werden kann. Ein anderer Weg, um die Schwankungen im kurzwelligen Bereich bei *eugametos*

auf ein Minimum herabzusetzen, wäre, abgesehen von der CO_2 -Konstanz, folgende experimentelle Anordnung:

Die Versuchszellen müssen längere Zeit und während des Versuches ständig mit Licht von $\lambda = 680 \text{ m}\mu$ bei hohen Intensitäten bestrahlt werden, so daß die Photosynthese dauernd zu einem Mindestmaß läuft. Zur Bestimmung der einzelnen Wirkungsstärken muß dann zusätzlich Licht der jeweiligen Wellenlänge als eigentliches Versuchslicht eingestrahlt werden. Der sonst auftretende Photosyntheseeffekt wäre auf ein Minimum herabgedrückt, wenn die Intensität des langwelligen Rot immer groß gegenüber der Intensität des Versuchslichtes ist. Diese Versuchsanordnung ist analog der Versuchsanordnung, die EMERSON und seine Mitarbeiter (9) zum Nachweis einer Lichtnebenwirkung bei der Photosynthese benutzt haben. Diese Parallele braucht nicht nur ein zufälliges Zusammentreffen zu sein, sondern kann zugleich die Bedeutung des spezifischen Lichtes bei der Kopulationsauslösung erhellen, indem es eben dieses spezifische Licht in eine Beziehung — wenn auch nicht zur assimilatorischen Leistung der Photosynthese, so doch zu ihrem physiologischen Mechanismus — setzt.

Der Wirkungsbereich des Zusatzlichtes von EMERSON (9) bei der Photosynthese deckt sich mit dem Wirkungsbereich des spezifischen Lichtes der Kopulation [FÖRSTER (6)]. Die Wirkung des Zusatzlichtes von EMERSON kann durch tiefe Temperaturen ersetzt werden. Die Dunkelinaktivierung kopulationsfähiger Zellen ist nach LEWIN und FÖRSTER analog dazu bei tiefen Temperaturen sehr langsam. Nimmt man an, daß im Licht ein Ferment aktiviert wird, das eine Funktion bei der Photosynthese hat, von der sekundär auch die Kopulationsauslösung abhängt und daß dieses Ferment nach Verdunkeln bei tiefen Temperaturen über längere Zeit aktiv bleibt, so führt diese Analogie zu einer Erklärung der spezifischen Lichtwirkung.

Bei dieser Theorie ist daran zu denken, daß O. WARBURG für die Rückreaktion der Photosynthese, die induzierte Atmung, ein lichtabhängiges Ferment fordert, das er bisher nicht nachweisen konnte. Vielleicht sind die Versuche von EMERSON nichts anderes, als die Entdeckung dieses postulierten Luminofermentes der induzierten Atmung.

Diese Hypothese, die das spezifische Licht für die Kopulation mit dem Mechanismus der Photosynthese verknüpft, würde die enge Kopplung zwischen photochemischer Reaktion und sauerstoffverbrauchender Reaktion erklären, sie würde mit der beschriebenen zusätzlichen Lichtatmung übereinstimmen und könnte auch den unerklärten Einfluß der Kohlensäure

bei der spezifischen Lichtwirkung auf die Kopulation verständlich machen. Danach wäre die induzierte Atmung der Photosynthese der spezielle stoffwechselphysiologische Vorgang, von dem die Gametenbildung abhängt, indem entweder Zwischenprodukte oder Energie der induzierten Atmung zur sexuellen Aktivierung notwendig sind. Den unerklärten CO_2 -Einfluß könnte man folgendermaßen verstehen:

Da die Photosynthese in ihrem Mechanismus ein Kreisprozeß ist [WARBURG, DEAN BURK (10)], so kann der physiologische Ausgangszustand der Zellen zu Beginn der Belichtung verschieden sein, je nachdem, welcher Teilprozeß des Gesamtzyklus am Anfang steht. Es kann Zellen geben, die im stationären Dunkelzustand die volle Sauerstoffkapazität aufgebaut haben und solche, die erst zu Beginn der Belichtung (durch die Aktivierung des Fermentes) die volle Sauerstoffkapazität aufbauen. Dann würde auch ohne Anwesenheit von CO_2 diese erste Teilreaktion ablaufen und die Zellen könnten, wenn sie von dieser Reaktion abhängig sind, kopulationsfähig werden.

Um den gesamten Kreisprozeß aber in Gang zu halten, so daß ständig jede Teilreaktion, u. a. die induzierte Atmung, abläuft, wäre dagegen die Anwesenheit von CO_2 erforderlich. Anderenfalls würde der Gesamtprozeß auf ein geringes Maß begrenzt, das durch die Produktion der Atmungskohlensäure gegeben ist. Diese Theorie könnte erklären, warum bei der Kopulationsauslösung ohne CO_2 ein Maximum durchlaufen wird.

Wenn die spezifische Lichtwirkung der Kopulation im Grunde die beschriebene Teilreaktion der Photosynthese ist, so werden die Differenzen in den Ergebnissen von LEWIN und FÖRSTER bedeutungslos. Je nach dem physiologischen Ausgangszustand der Zellen, ob zuerst die Sauerstoffkapazität der Zellen aufgebaut werden muß oder ob der Kreisprozeß schon bei voll aufgebauter Sauerstoffkapazität beginnt, würde man ein verschiedenes Spektrum erhalten. Im ersten Fall wäre das Wirkungsspektrum das Absorptionsspektrum des Fermentes. Im zweiten Fall müßte das Wirkungsspektrum das Absorptionsspektrum des Chlorophylls sein, das die für die Reaktion der Kohlensäure erforderliche Lichtenergie absorbiert.

Man kann dann auf Grund dieser Hypothese verstehen, warum LEWIN Photosynthese und Kopulation mit Phenylurethan in gleicher Konzentration hemmen konnte, warum er ein Wirkungsspektrum fand, das mit dem Absorptionsspektrum der Zellen übereinstimmt und trotzdem in anderen Versuchen Zellen ohne CO_2 sexuell aktivieren konnte.

Diese Deutung für die Differenz zwischen LEWIN und FÖRSTER ist wahrscheinlicher, als die zuerst gegebene Deutung, daß der Unterschied primär durch eine Verbesserung der sexuellen Potenz bedingt ist¹⁾.

Für Photosyntheseversuche folgt aus der dargelegten Theorie, daß zu Beginn der Belichtung in einem Fall Induktionszeiten zu erwarten sind, weil erst die Sauerstoffkapazität über die Fermentaktivierung aufgebaut werden muß, und im anderen Falle keine Induktionszeiten zu erwarten sind, da die volle Sauerstoffkapazität vorhanden ist. Solche Differenzen waren mehrfach strittige Punkte verschiedener Photosynthesearbeiten.

5. Zusammenfassung

1. Die sexuelle Potenz von *eugametos*-♂♂ läßt sich durch Photosynthese verbessern.
2. Die spezifische Lichtwirkung zur Auslösung der Sexualität geht nicht über die CO₂-Assimilation.
3. Die spezifische Lichtwirkung ist obligatorisch an die Anwesenheit von Sauerstoff gebunden.
4. Die spezifische Lichtwirkung ist von Kohlensäure abhängig.
5. Die Kopulationsbereitschaft und die Gamonabgabe der ♀♀ ist schlecht bzw. stark gehemmt unter anaeroben Bedingungen.
6. Unter aeroben Bedingungen ohne Licht ist die Kopulationsfähigkeit maximal, nicht aber die Gamonabgabe. Bei starker Belichtung, wenn die Zellen durch Photosynthese viel Energie gewinnen können, steigen die Gamonausbeuten über den Wert im Dunkeln.
7. Es wird eine Hypothese diskutiert, die die kopulationsauslösende Wirkung des Lichtes mit dem Mechanismus der Photosynthese in Zusammenhang setzt.

1) Zu bemerken ist dabei, daß FÖRSTER (unveröffentlicht) an *moewusi* +, dem den *eugametos*-♂♂ homologen Geschlecht, bei der gleichen Anzucht, wie sie für *eugametos*-♂♂ verwendet wurde (periodischer Hell-Dunkel-Wechsel; 4 Wochen alte Kulturen; LEWIN kultivierte bei Dauerlicht acht Tage) den gleichen charakteristischen Abfall von Gelb nach Rot in der Wirkungsstärke des Lichtes fand, wie bei *eugametos*-♂♂.

Literatur

1. KLEBS, G., Die Bedingungen der Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen. Verlag Fischer, Jena 1928.
2. SAGER, R., u. GRANICK, S., (1954), Nutritional control of sexuality in *Chlamydomonas reinhardtii*. J. gen. Physiol. **37**, 729.
3. BERNSTEIN, E., u. JAHN, T. L. (1955), Certain Aspects of the Sexuality of Two Species of *Chlamydomonas*. J. Protozool. **2**, 81.
4. TSUBO, Y. (1956), Observations on Sexual Reproduction in a *Chlamydomonas*. The Botanical Magazine, Tokyo, **69**, No. 811.
5. LEWIN, R. A. (1956), Control of sexual activity in *Chlamydomonas* by light. J. gen. Microbiol. **15**, 170.
6. FÖRSTER, H. (1957), Das Wirkungsspektrum der Kopulation von *Chlamydomonas eugametos*. Z. Naturforschg. **12b**, 765.
7. — u. WIESE, L. (1954), Gamonwirkungen bei *Chlamydomonas eugametos*. Z. Naturforschg. **9b**, 548.
8. WARBURG, O., u. KRIPPAHL, G. (1954), Messungen der Lichtabsorption in *Chlorella* mit der ULBRICHTSchen Kugel. Z. Naturforschg. **9b**, 181.
9. EMERSON, R., CHALMERS, R., u. CEDERSTRAND, C. (1957), Some factors influencing the long-wave limit of photosynthesis. Proc. Nat. Acad. Sc. **43**, 133.
10. BURK, DEAN, u. WARBURG, O. (1951), Ein Quanten-Reaktion und Kreisprozeß der Energie bei der Photosynthese. Z. Naturforschg. **6b**, 12.

Anschrift des Verfassers: INGO STIFTER, Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. WEIDEL, Tübingen, Corrensstraße 38.

Druckfehlerberichtigung

- 1) zum Beitrag A. POCHMANN in Arch. f. Protistenkunde **102** (1), 1957:
 - S. 52, 8. Zeile von unten, statt „Zellkontur“ soll stehen „Seilkontur“.
 - S. 69, 6. Zeile von unten, statt „*Erkenia*“ soll stehen „*Chromulina erkensis*“ und statt „p. 254“ (in Klammern) „p. 242“.
 - S. 81, bei PRESCOTT, Figur 27 in Spalte „Spätere Bezeichnung“ soll stehen: „*Ph. undulatus* (SKV.) POCHM. var. *maior* (PRESC.) HUBER-PESTALOZZI 1955, p. 245.“
- 2) zum Beitrag A. POCHMANN in Arch. f. Protistenkunde **103** (3/4), 1959:
 - S. 510, 3. Zeile der Fußnote, anstatt „ovalen“ muß es oralen“ Region heißen.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. AUTRUM

2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. KÄSTNER

Tag der mündlichen Prüfung: . November 1959

16. 12.

Lebenslauf

Ich wurde als Sohn des Dipl.-Ing. für Vermessungswesen Othmar Stifter und seiner Frau Bertha, geb. Much am 13. 6. 1930 in Trentschin (CSR) geboren. Dort, und von 1939 an in Krummau/Moldau besuchte ich die Volksschule. 1941 trat ich in Ried/Innkreis (Oberösterreich) in die Oberschule ein. Von 1946 an besuchte ich die Oberrealschule für Jungen in Passau/Donau und bestand hier im Jahr 1950 das Abitur. In den Jahren 1950—1955 studierte ich an der Phil.-theol. Hochschule Passau und an der Universität München Naturwissenschaften. 1955/56 legte ich das Staatsexamen für das Höhere Lehramt in München ab. Anschließend verfaßte ich unter Anleitung von Prof. Dr. Max Hartmann die vorliegende Dissertation. Seit März 1959 bin ich als Studienassessor in Baden-Württemberg tätig.

Abdruck aus

Archiv für Protistenkunde Bd. 104 1959

Begründet von **Fritz Schaudinn**

Herausgegeben von

Karl G. Grell und Johannes Buder

Tübingen

Halle (Saale)

Lizenznummer ZLN 5085

VEB GUSTAV FISCHER VERLAG JENA